

Modulation of the neuroinflammatory response after spinal cord injury

Citation for published version (APA):

van Neerven, S. G. A. (2011). *Modulation of the neuroinflammatory response after spinal cord injury*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20110420sn>

Document status and date:

Published: 01/01/2011

DOI:

[10.26481/dis.20110420sn](https://doi.org/10.26481/dis.20110420sn)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The aim of the present thesis was to study novel therapeutic approaches to modulate the inflammatory reaction that follows experimental SCI to induce improved motor function and reduced pain. As early pro-inflammatory cytokine production after SCI is essential for the initiation and the maintenance of the inflammatory reaction, as a first strategy the cytokine transcript reducing effect of the nuclear hormone receptor ligands retinoic acid (RA) and T0901317 (T09) was investigated.

As a second strategy, boosting of beneficial effects of the inflammatory reaction was studied via exogenous application of the growth factor VEGF after SCI.

The first chapter of this thesis briefly gives an introduction into the clinical problems that arise after damage to the spinal cord. Patients with spinal cord injury not only suffer from the devastating consequences of sensory and motor loss, a substantial percentage develops chronic pain after injury. Sufficient pain relief cannot be achieved with the current analgesics available and therefore this pain often leads to decreased quality of life, depression and even suicide in SCI patients. This first chapter gives also an impression how we study these aspects of long term outcome in animal models of SCI. A crucial event that determines long term outcome after SCI is the inflammatory reaction that follows the initial damage. As such, this first chapter describes the cellular and molecular events that occur during this inflammatory reaction.

The second chapter of this thesis provides information about two members of the nuclear hormone receptor family; peroxisome proliferator activated receptors (PPAR/RXR) and retinoic acid receptors (RAR/RXR). This chapter sheds light on how the activation of these receptors may be involved in different neurological and psychiatric diseases, and how their activation may provide neuroprotection.

The third chapter of this thesis describes the relevance of PPAR and RAR/RXR activation in spinal cord injury. The data demonstrate that RAR/RXR and PPAR/RXR are activated after SCI and that targeting PPAR/RXR and RAR/RXR activation by natural or synthetic ligands may be able to reduce inflammatory processes after SCI.

Chapter four describes the *in vitro* testing of RAR/RXR natural ligand all-*trans* RA as a potential anti-inflammatory agent. To mimic an inflammatory reaction *in vitro*, primary astrocyte cultures were stimulated with bacterial products and RA was administered as an intervention method to reduce this inflammatory reaction. The data described

in this chapter not only demonstrate the anti-inflammatory effect of RA on chemokine production by astrocytes, it also sheds light on the molecular mechanisms that may underlie this RA effect.

Chapter five of this thesis demonstrates that the anti-inflammatory effect of RA is not only restricted to chemokine production by primary astrocytes. RA also reduced the expression and production of pro-inflammatory cytokines *in vitro*.

Chapter six describes the *in vivo* application of RA as a strategy to reduce pro-inflammatory cytokine expression after experimental SCI. Two different routes of application were tested in this study, local application via intrathecal catheters and systemic application via an intraperitoneal injection. Only after systemic application, but not after local administration, RA was able to reduce transcript levels of pro-inflammatory cytokines. This study points out that the route of administration of a drug differentially affects the efficacy of a drug.

Chapter seven describes the application of T09, a ligand for nuclear hormone receptor LXR, as a strategy to reduce inflammation after SCI. T09 was also tested *in vitro* for its potential pro-inflammatory cytokine gene transcription reducing properties. Unfortunately T09 was unable to reduce pro-inflammatory cytokine expression in primary astrocytes stimulated with bacterial products, nor was it able to reduce transcript levels of pro-inflammatory cytokines in an experimental model of SCI.

In chapter eight boosting of beneficial effects of the inflammatory reaction was studied via exogenous application of the growth factor VEGF. VEGF was administered during the first week after SCI via single intrathecal bolus injections every day. This treatment resulted in only limited therapeutic benefit, since glial scar formation, tissue sparing and motor performance appeared unaffected after SCI by VEGF treatment. Pain behavior after SCI was slightly affected by VEGF treatment; VEGF had a small reducing effect on mechanical hypersensitivity, whereas thermal hypersensitivity appeared unaffected.

Finally chapter nine summarizes the results of the studies described in this thesis. It provides also an overview about the chemical compounds that are used to modulate the inflammatory reaction after SCI. This overview shows us that there are many substances pre-clinically tested, whereas only a few are in clinical trials yet. So probably these pre-clinical data give insufficient confidence to start human clinical trials? But why do we find than only limited beneficial effects pre-clinically? This gives us some reason to consider the way we think about inflammatory reactions in general. We now focused mainly on either stimulating beneficial or inhibiting detrimental events after SCI, although both events

occur often simultaneously along the course of inflammation. Good and bad events may be inevitably interdependent on each other, which makes it very difficult or even impossible to achieve neuroprotection by just boosting good or reducing bad events.

Changing the character of inflammation may be a good alternative that may provide neuroprotection after SCI. A crucial role within this concept may be dedicated to different activation patterns of glial cells that result from the molecular cues these cells encounter. Modulation of glial activation patterns may be able to change the nature of the inflammatory reaction to achieve effective treatment for SCI.

Samenvatting

Het doel van het huidige proefschrift was om nieuwe therapeutische strategieën te testen die de ontstekingsreactie die volgt na een dwarslaesie kunnen moduleren, om uiteindelijk ervoor te zorgen dat motor uitkomst verbeterd en pijn verminderd wordt na dwarslaesie. Sinds vroege productie van pro-inflammatoire cytokinen een essentiële rol speelt in het ontstaan en onderhouden van deze ontstekingsreactie, werd als eerste strategie het transcriptie verminderende effect op pro-inflammatoire cytokinen onderzocht door toediening van de liganden voor nucleaire hormoon receptoren retinolzuur (RA) en T0901317 (T09).

Als tweede strategie werd er gekeken wat het effect was van het stimuleren van de goede effecten van een ontstekingsreactie, zoals door het additioneel toedienen van de groeifactor VEGF na dwarslaesie.

Het eerste hoofdstuk geeft kort een inleiding in het klinische probleem dat ontstaat in patiënten met een dwarslaesie. Patiënten met een dwarslaesie lijden niet alleen onder de ernstige consequenties van het niet kunnen lopen en gevoelloosheid, een aanzienlijk gedeelte ontwikkelt ook chronische neuropathische pijn. Deze pijn kan niet behandeld worden met de huidige voorhanden medicatie en leidt daardoor vaak tot een sterk verminderde kwaliteit van leven in deze patiënten. Depressie en zelfmoord komen dan ook niet zelden voor. Dit eerste hoofdstuk geeft ook een idee over hoe we deze aspecten van lange termijn uitkomsten na dwarslaesie kunnen nabootsen en bestuderen in diermodellen. Een cruciale gebeurtenis, die ook de lange termijn uitkomsten na dwarslaesie bepaald, is de ontstekingsreactie die volgt op de initiële schade aan het ruggemerg. Daarom beschrijft het eerste hoofdstuk van dit proefschrift de cellulaire en moleculaire gebeurtenissen die plaatsvinden gedurende deze ontstekingsreactie.

Het tweede hoofdstuk van dit proefschrift geeft informatie over twee receptoren die behoren tot de familie van nucleaire hormoon receptoren, en wel peroxisome proliferator activated receptor (PPAR/RXR) en de retinolzuur receptoren (RAR/RXR). Dit hoofdstuk licht toe hoe activatie van deze receptoren betrokken kan zijn in verschillende neurologische en psychiatrische ziekten en hoe activatie van deze receptoren mogelijk tot neuroprotectie kan leiden.

Het derde hoofdstuk van dit proefschrift beschrijft de relevantie van PPAR/RXR en RAR/RXR activatie na dwarslaesie. De data beschreven in dit hoofdstuk laten zien dat RAR/RXR worden geactiveerd na dwarslaesie en dat het activeren van PPAR/RXR en RAR/RXR door natuurlijke dan wel synthetische liganden mogelijk zou kunnen leiden tot een verminderde ontstekingsreactie na dwarslaesie.

Het vierde hoofdstuk van dit proefschrift beschrijft het bestuderen van het mogelijke anti-inflammatoire effect van retinolzuur, het natuurlijk ligand voor RAR/RXR. Om een ontstekingsreactie *in vitro* na te bootsen werden primaire astrocyten bloot gesteld aan producten van bacteriën. Dit veroorzaakt een ontstekingsreactie in astrocyten welke gepaard gaat met de productie en expressie van ontstekingsfactoren. Retinolzuur werd als interventie methode gegeven om deze ontstekingsreactie tegen te gaan, wat resulteerde in verminderde chemokine expressie en productie door deze cellen. Dit hoofdstuk licht ook toe welke moleculaire mechanismen ten grondslag liggen aan dit chemokine verminderende effect.

Hoofdstuk vijf van dit proefschrift laat zien dat het ontstekingsremmende effect van retinolzuur zich niet alleen beperkt tot verminderde chemokine afgifte door astrocyten. Productie van ontsteking stimulerende cytokinen door astrocyten bleek namelijk ook verminderd door behandeling met retinolzuur.

Het zesde hoofdstuk van dit proefschrift beschrijft de toepassing van retinolzuur als een strategie om cytokine expressie te verminderen in een model voor dwarslaesie. In dit experiment werden twee routes van toepassing van retinolzuur onderzocht, enerzijds werd het retinolzuur lokaal gegeven via een intrathecale catheter, anderzijds werd het retinolzuur systemisch gegeven via een intraperitoneale injectie in de buikholte. Retinolzuur was alleen na systemische toediening in staat om transcriptie niveaus van pro-inflammatoire cytokinen te remmen, niet na locale toediening. Deze studie benadrukt dat de route van toepassing van een medicament de effectiviteit van een medicijn verschillend bepaald.

Hoofdstuk zeven laat de toepassing van T09, welke een ligand is voor de nucleaire hormoon receptor LXR, als een strategie om genexpressie van ontsteking stimulerende cytokinen te remmen in een model voor dwarslaesie. T09 werd ook in getest in primaire astrocyt culturen gestimuleerd met bacteriële producten als mogelijk cytokine expressie verminderend medicament. Helaas was T09 niet in staat expressie van cytokinen te remmen in primaire astrocyten. Eveneens in het model voor dwarslaesie was T09 niet in staat de expressie van cytokinen te verminderen.

In hoofdstuk 8 werd onderzocht of het stimuleren van de goede effecten van een ontstekingsreactie door het exogeen toedienen van de groeifactor VEGF kan leiden tot neuroprotectie en functionele verbeteringen na experimentele dwarslaesie. VEGF werd gedurende de eerste week na dwarslaesie gegeven via een intrathecale catheter bestaande uit een enkele bolus injectie per dag. Deze behandeling leidde echter maar tot beperkte therapeutische verbetering na dwarslaesie. Litteken weefsel vorming door glia cellen, weefsel sparing en motorische verbeteringen bleken niet veranderd door de behandeling met VEGF. Ook werd er in deze studie naar pijn-gedrag gekeken van geletselde dieren; VEGF bleek een klein verbeterend effect te hebben op mechanische hypersensitiviteit, thermische hypersensitiviteit bleek echter niet veranderd.

Het laatste hoofdstuk vat de resultaten van dit proefschrift samen. Het geeft ook een overzicht over de literatuur die al bekend is over verschillende pre-klinisch onderzochte therapieën met het oog op het verkrijgen van neuroprotectie na dwarslaesie. Dit overzicht laat ons zien dat al vele medicamenten pre-klinisch getest zijn voor hun neuroprotectieve eigenschappen, hoewel er momenteel maar weinig medicamenten daadwerkelijk in klinische trials getest worden. Blijkbaar bieden deze pre-klinische studies dus onvoldoende vertrouwen, om klinische trials in mensen met dwarslaesie te starten. Maar hoe komt dit dan, dat we eigenlijk maar beperkte neuroprotectieve effecten vinden van de medicamenten die we pre-klinisch testen? Dit geeft stof tot nadenken over hoe wij momenteel tegen een ontstekingsreactie aankijken. We hebben onze strategieën nu vooral gericht op het enerzijds remmen van slechte effecten, dan wel het anderzijds stimuleren van de goede effecten van een ontstekingsreactie, terwijl vele van deze goede en slechte effecten juist gelijktijdig plaatsvinden. Goede en slechte gebeurtenissen gaan misschien hand in hand en zijn daardoor onlosmakelijk met elkaar verbonden gedurende de ontstekingsreactie. Dit maakt het wel heel moeilijk of misschien wel onmogelijk om neuroprotectie te bereiken door enkel en alleen goede dan wel slechte effecten te stimuleren dan wel te remmen.

Een goed alternatief om neuroprotectie te bereiken, kan het veranderen van het karakter van een ontstekingsreactie na dwarslaesie zijn. Een cruciale rol binnen dit concept kan weggelegd zijn voor de verschillende activatie patronen die glia cellen kennen als reactie op de moleculen die deze cellen tegenkomen. Modulatie van deze activatie patronen kan er misschien toe leiden dat een ontstekingsreactie anders verloopt en dat dit gepaard gaat met een meer behoudende aard en neuroprotectie.